

Gazzetta Ufficiale n. 296 del 19 -12-1998

MINISTERO DELLA SANITA'

DECRETO 14 ottobre 1998.

Modificazioni all'allegato al decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, e successive modifiche, in attuazione della direttiva 97/61/CE.

IL MINISTRO DELLA SANITA'

Visto il decreto legislativo 30 dicembre 1992, numero 530 concernente attuazione della direttiva 91 492 CEE, che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;

Vista la legge 20 novembre 1995, n. 490, recante conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 20 settembre 1995, n. 390, concernente provvedimenti urgenti in materia di prezzi di specialita' medicinali, nonche' in materia sanitaria;

Visto il decreto legislativo 15 marzo 1996, n. 249, recante modificazioni al decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, concernente attuazione della direttiva 91 492 CEE che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;

Vista la direttiva 97 61 CE del 20 ottobre 1997, che modifica l'allegato alla direttiva 91 492 CEE, che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;

Visto il decreto del Ministero della sanita' 31 luglio 1995 concernente metodiche di analisi per la determinazione dei coliformi fecali, di Escherichia coli, delle salmonelle, delle biotossine PSP (Paralytic Shellfish Poison), delle tossine DSP (Diarrhetic Shellfish Poison), del mercurio e del piombo nei molluschi bivalvi (pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 279, del 29 novembre 1995);

Vista la decisione del Consiglio 93/383/CEE del 14 luglio 1993 in materia di laboratori di riferimento per il monitoraggio delle biotossine marine;

Considerato che la direttiva 97 61 CEE apporta modifiche tecniche alla direttiva 91 492 CEE;

Visto l'art. 17 del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530;

Visto l'art. 20 della legge 16 aprile 1987, n. 183, concernente il coordinamento delle politiche riguardanti l'appartenenza dell'Italia alle Comunita' europee e l'adeguamento dell'ordinamento interno agli atti normativi comunitari;

Decreta:

Art. 1.

1. All'allegato del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, sono apportate le seguenti modificazioni:

a) il testo del punto 6 del capitolo II e' sostituito dal seguente:

"6. Un documento di registrazione per identificare i lotti di molluschi bivalvi vivi deve accompagnare ogni lotto durante il trasporto dalla zona di produzione al centro di spedizione, al centro di depurazione, alla zona di stabulazione o allo stabilimento di trasformazione. Il documento e' rilasciato dall'autorita' competente su richiesta del produttore. Il produttore deve compilare per ciascun lotto, in caratteri leggibili e indelebili, le sezioni pertinenti del documento di registrazione, in cui devono essere riportate le seguenti indicazioni:

a) identita' e indirizzo del produttore;

b) data di raccolta;

c) ubicazione della zona di produzione, definita in maniera circostanziata, oppure con un numero di codice;

d) status sanitario della zona di produzione come previsto al capitolo I;
e) precisa indicazione della specie di molluschi bivalvi vivi e della relativa quantita';
f) numero di riconoscimento e luogo di destinazione per il confezionamento, la stabulazione, la depurazione o la trasformazione. Il documento di registrazione deve essere datato e firmato dal produttore.

I documenti di registrazione devono essere numerati in maniera continua e in ordine di successione. L'autorita' competente tiene un registro in cui figurano il numero dei documenti di registrazione e il nome delle persone che raccolgono i molluschi bivalvi vivi a cui sono stati rilasciati. Il documento di registrazione deve riportare la data di consegna dello stesso al centro di spedizione, al centro di depurazione, alla zona di stabulazione o allo stabilimento di trasformazione e deve essere conservato dai responsabili dei suddetti centri, zone o stabilimenti per almeno dodici mesi. Il produttore e' ugualmente tenuto a conservare il documento per lo stesso periodo di tempo. Tuttavia se la raccolta e' effettuata da addetti del centro di spedizione, del centro di depurazione, della zona di stabulazione o dello stabilimento di trasformazione di destinazione, il documento di registrazione puo' essere sostituito da un'autorizzazione permanente di trasporto rilasciata dall'autorita' competente. Un modello standardizzato del documento di registrazione, contenente un riferimento ai vari requisiti che devono figurarvi e menzionati ai capitoli II, III e IV del presente allegato, sara' stabilito con decreto del Ministro della sanita' in conformita' a decisioni comunitarie";

b) il testo del punto 9 del capitolo III e' sostituito dal seguente:

"9. Durante il trasporto dalla zona di stabulazione, dove sono stati raccolti, al centro di spedizione, al centro di depurazione, allo stabilimento di trasformazione riconosciuti, i lotti devono essere accompagnati da un documento di registrazione contenente in particolare, oltre alle indicazioni previste al Capitolo II, punto 6 del presente allegato, l'ubicazione e il numero di riconoscimento della zona di stabulazione e l'indicazione della durata della stabulazione effettuata, nonche' qualsiasi altra indicazione necessaria per l'identificazione e la rintracciabilita' del prodotto. Tale requisito non e' necessario nel caso in cui, sia nella zona di stabulazione che nel centro di spedizione, nel centro di depurazione o nello stabilimento di trasformazione, operino gli stessi addetti";

c) il testo del secondo comma del punto 13 della sezione III del capitolo IV e' sostituito dal seguente:

"I centri di depurazione che inviano lotti di molluschi bivalvi vivi a centri di spedizione devono fornire un documento di registrazione contenente in particolare, oltre alle indicazioni previste al Capitolo II, punto 6 del presente allegato, il numero di riconoscimento e l'indirizzo del centro di depurazione e l'indicazione della durata del processo di depurazione effettuata, le date di ingresso e uscita dal centro di depurazione nonche' qualsiasi altra indicazione necessaria per l'identificazione e la rintracciabilita' del prodotto".

d) il testo del punto 4 della sezione IV del capitolo IV e' sostituito dal seguente;

"I centri di spedizione devono tenere a disposizione dell'autorita' competente i seguenti dati:

a) i risultati degli esami microbiologici dei molluschi bivalvi vivi provenienti da una zona di produzione riconosciuta o da una zona di stabulazione o da un centro di depurazione;

b) la data e la quantita' di molluschi bivalvi vivi consegnati al centro di spedizione e i documenti di registrazione pertinenti;

c) dati particolareggiati sulle spedizioni, inclusi i nomi e gli indirizzi dei destinatari, la data e la quantita' di molluschi bivalvi vivi spediti e il/i numero/i del/i documento/i di registrazione d'ingresso corrispondente/i alle spedizioni di molluschi.

Tali dati devono essere classificati cronologicamente e archiviati per un periodo di almeno dodici mesi, che dovra' essere precisato

dall'autorita' competente".

e) al capitolo V e' aggiunto il seguente punto;
"7-bis) il tenore di 'Amnesic Shellfish Poisoning' (ASP) nelle parti commestibili dei molluschi (corpo intero o parti commestibili separatamente) non deve superare i 20 microgrammi di acido domoico per grammo secondo il metodo di analisi HPLC".

Art. 2.

1. Ai fini della determinazione delle biotossine algali ASP e' approvato il metodo di analisi riportato in allegato.

Art. 3.

1. Il laboratorio nazionale di riferimento per il monitoraggio delle biotossine marine e' il Centro ricerche marine, viale A. Vespucci 2 - Cesenatico (Forli').
2. Il presente decreto e' trasmesso alla Corte dei conti per la registrazione ed entra in vigore il giorno dopo la sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 14 ottobre 1998

Il Ministro: Bindi

Registrato alla Corte dei conti il 23 novembre 1998

Registro n. 2 Sanita', foglio n. 105

ALLEGATO

METODO PER L'IDENTIFICAZIONE E LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO DOMOICO NEI MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCI

1. Scopo e campo di applicazione

Il metodo descritto permette l'identificazione e la determinazione dell'acido domoico nei molluschi eduli lamellibranchi. Il limite di rivelazione del metodo e' di 0,2 micron g di acido domoico per g di tessuto edibile.

2. Principio del metodo

L'acido domoico e' estratto dalla polpa dei molluschi con soluzione metanolo: acqua, 1 : 1 (v : v), e, dopo ultrafiltrazione, e' determinato mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) su colonna C18 con rivelazione spettrofotometrica UV, alla lunghezza d'onda di 242 nm.

3. Reagenti

- 3.1 Tutti i reagenti impiegati devono essere di qualita' analitica.
- 3.2 L'acqua usata deve essere bidistillata.
- 3.3 Acetonitrile.
- 3.4 Acido domoico.
- 3.5 Metanolo.
- 3.6 Acido trifluoroacetico (TFA) per spettroscopia.

4. Apparecchiature

- 4.1 Vetreria di laboratorio.
- 4.2 Bilancia tecnica.
- 4.3 Bilancia analitica.
- 4.4 Omogeneizzatore a lame rotanti.
- 4.5 Omogeneizzatore ad immersione.
- 4.6 Centrifuga.
- 4.7 Unita' filtro di tipo Millipore Ultrafree-MC, membrana PLGC, a basso assorbimento, da 10.000 NMWL, o unita' filtro equivalenti.
- 4.8 Sistema per degassaggio eluenti.
- 4.9 Pompa per HPLC.
- 4.10 Valvola d'iniezione con loop fisso.
- 4.11 -Sistema di termostatazione colonne.
- 4.12 Pre-colonna-per HPLC impaccata con 5 micron m di ODS.
- 4.13 Colonna analitica per HPLC (250 x 4.6 mm), impaccata con 5 micron m di ODS, termostatata a 40 > C (4.11).
- 4.14 Rivelatore spettrofotometrico UV.
- 4.15 Sistema per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

5. Soluzioni

5.1 Soluzione acetonitrile : acqua, 10 : 90 (v : v).

5.2 Soluzione concentrata di acido domoico (100 micron g/mL).

Pesare 0,5 mg di acido domoico (3.4) e disciogliere in 5,0 mL di soluzione acetonitrile : acqua, 10 : 90 (v : v) (5.1).

5.3 Soluzioni di riferimento. Diluire la soluzione concentrata di acido domoico (5.2) con soluzione acetonitrile : acqua, 10 : 90 (v : v) (5.1) in modo da ottenere soluzioni di concentrazioni di 0,4 micron g/mL, 2,0 micron g/mL, 4,0 micron g/mL e 8,0 micron g/mL di acido domoico.

5.4 Soluzione estraente di acqua : metanolo, 1 : 1 (v : v).

5.5 Fase mobile. Miscelare 100 mL acetonitrile (3.3) con 400 mL di acqua (3.2); aggiungere 0,2 mL TFA (3.6), e portare a volume con acqua (3.2) in matraccio tarato da 1000 mL Assicurare il degassaggio della fase mobile.

6. Procedimento

6.1 Preparazione del campioni

6.1.1 Pulire esternamente, lavandoli con acqua, i molluschi da analizzare.

6.1.2 Aprire i molluschi tagliando i muscoli adduttori e rimuovere i tessuti molli (polpa) del mollusco dalla conchiglia. Non si devono usare ne' calore, ne' anestetici prima di aprire il mollusco e nel corso dell'operazione bisogna evitare di danneggiare o tagliare il corpo.

6.1.3 Prelevare un campione di ca. 100 g di polpa (6.1.2) e trasferirlo su una retina di plastica, lasciando scolare per 5 minuti.

6.1.4 Omogeneizzare il campione (6.1.3) con omogeneizzatore a lame rotanti (4.4).

Conservare la polpa residua (6.1.3) a temperatura ≤ -10 °C.

6.2 Estrazione

6.2.1 Pesare accuratamente un'aliquota di 4 g di campione omogeneizzato (6.1.4) e trasferirla in un tubo da centrifuga graduato.

6.2.2 Aggiungere all'omogeneizzato (6.2.1) 16,0 mL di soluzione estraente (5.4) ed estrarre con omogeneizzatore ad immersione (4.5) per 3 min a 10.000 rpm.:

6.2.3 Centrifugare (4.6) l'estratto (6.2.2) a 3000 rpm per 10 min.

6.3 Ultrafiltrazione

6.3.1 Prelevare dalla fase liquida (6.2.3) un'aliquota di 0,1 mL e trasferirla nell'unita' di ultrafiltrazione (4.7).

6.3.2 Ultrafiltrare centrifugando per 30 minuti a 9000 rpm.

Note: Analizzare l'estratto filtrato (6.3.2) in un breve intervallo di tempo.

Conservare gli estratti residui (6.3.1) a temperatura ≤ -10 °C.

6.4 Determinazione HPLC-UV

6.4.1 Condizioni cromatografiche

- separazione mediante eluizione isocratica, a 40 °C (4.11);

- fase mobile: (5.5);

- flusso: 1 mL/min;

- volume iniettato 20 micron L;

- rivelazione spettrofotometrica a 242 nm.

6.4.2 Costruzione della curva di taratura.

Iniettare le soluzioni di riferimento (5.3);

costruire una curva di taratura di tipo $y = ax + b$,

dove: y = area del picco dell'acido domoico; x = concentrazione della soluzione di riferimento (5.3) in micron g/mL; a = coefficiente angolare; b = intercetta sull'asse delle y .

6.4.3 Analisi dei campioni per la ricerca di acido domoico:

iniettare 20 micron L di estratto filtrato (6.3.2) per la determinazione HPLC-UV.

Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del "bianco- reagente", applicando l'intero metodo di analisi omettendo la porzione di campione per l'analisi. Nel cromatogramma del bianco-reagente non dovrebbero essere presenti picchi interferenti con l'acido domoico, oppure presenti a livelli trascurabili.

7. Identificazione;

7.1 L'identificazione dell'acido domoico si ottiene per confronto del tempo di ritenzione del picco del campione ed il tempo di ritenzione del picco dello standard di acido domoico.

7.2 Per informazioni supplementari ricorrere alla co-cromatografia.

7.2.1 Ripartire l'estratto (6.3.2) in 2 aliquote:

a) su un aliquota effettuare direttamente la determinazione HPLC-UV (6.4);

b) aggiungere all'altra aliquota un volume trascurabile di soluzione standard di acido domoico (5.2 o 5.3) in modo tale da ottenere una concentrazione finale di acido domoico nell'estratto pari a circa il doppio della concentrazione che si ritiene presente nell'estratto in esame.

7.2.2 L'identificazione del picco dell'acido domoico nell'aliquota (7.2.1.b) e' basata sulla presenza di un picco, la cui area incrementa rispetto all'area del picco dell'estratto non addizionato (7.2.1, a) in modo proporzionale alla quantita' di analita addizionato. La larghezza del picco (7.2.1, b), misurata a meta' altezza, deve essere 90-110 % della larghezza ottenuta per il picco dell'estratto non addizionato (7.2.1, a) ed il tempo di ritenzione deve coincidere con quello del picco ottenuto per l'estratto non addizionato (7.2.1, a).

8. Determinazione

8.1 La determinazione quantitativa e' realizzata mediante interpolazione dell'area del picco dell'acido domoico nell'estratto campione sulla curva di taratura (6.4.2).

8.2 Per campioni ad elevate concentrazioni di acido domoico e' opportuno procedere a diluizioni dell'estratto filtrato (6.3.2): prima della determinazione cromatografica, al fine di ottenere una concentrazione di analita compresa nell'intervallo di linearita' verificato (6.4.2).

8.3 Espressione dei risultati

La concentrazione C di acido domoico, espressa in $\mu\text{g/g}$ di acido domoico per g di polpa, e' calcolata secondo la seguente equazione:

$$C = \frac{y - b}{a} \times \frac{100}{V} \times \frac{1}{m} \times D$$

dove:

y = Area del picco di acido domoico dell'estratto campione (6.4.3).

b = Intercetta della curva (6.4.2) sull'asse delle y.

a = Coefficiente angolare della curva di taratura (6.4.2).

Rm = Recupero medio (%), calcolato come al punto 9.2.9.

V = Volume finale dell'estratto (6.2.2).

m = Massa in g dell'aliquota di campione (6.2.1).

D = Fattore di diluizione (se e' stata operata una diluizione dell'estratto) (8.2).

9. Valutazione del metodo

9.1 Limite di rivelazione.

Il limite di rivelazione del metodo, calcolato con un S/N = 5 : 1, e' pari a 0,2 $\mu\text{g/g}$ di acido domoico per g di polpa.

9.2 Calcolo del recupero

9.2.1 Valutare il recupero del metodo effettuando prove di recupero su "bianco-campione" di molluschi per il quale attraverso precedenti determinazioni cromatografiche sia stata dimostrata l'assenza del picco dell'acido domoico o di picchi interferenti nell'intorno del tempo di ritenzione dell'acido domoico.

9.2.2 Preparare il bianco-campione come descritto in 6.1 fino ad ottenere un omogeneizzato di bianco-campione.

9.2.3 Suddividere il bianco-campione omogeneizzato (9.2.2) in un numero di aliquote corrispondenti ai livelli di fortificazione, piu' un'aliquota per la prova in bianco.

9.2.4 Fortificare le aliquote (9.2.3) ad eccezione dell'aliquota destinata alla prova in bianco, con ridotti volumi di soluzione concentrata di acido domoico (5.2) in modo da ottenere in ogni aliquota una diversa concentrazione di acido domoico (livello di fortificazione). I livelli di fortificazione devono essere almeno 2.

9.2.5 Procedere con l'estrazione e l'analisi dei campioni fortificati e della prova in bianco come descritto in 6.2 - 6.4.

9.2.6 Verificare l'assenza di picchi nell'intorno tempo di ritenzione dell'acido domoico nella prova in bianco.

9.2.7 Calcolare il recupero in percentuale (R), sui campioni fortificati, come segue:

$$R = \frac{y-b}{a} \times 100$$

$$R = \frac{y-b}{a} \times 100$$

$$R = \frac{y-b}{a} \times 100$$

dove:

y = Area del picco di acido domoico dell'estratto campione (6.4.3).

b = Intercetta della curva (6.4.2) sull'asse delle y.

a = Coefficiente angolare della curva di taratura (6.4.2).

Cf = Concentrazione teorica di acido domoico nell'aliquota di campione fortificato (9.2.4).

V = Volume finale dell'estratto (6.2.2).

m = Massa in g dell'aliquota di campione (6.2.1).

9.2.8 Eseguire le prove di recupero, per ciascun livello di fortificazione, in triplicato, per due giorni consecutivi (n >= 12).

9.2.9 Stima dell'accuratezza e precisione.

Analizzare statisticamente i valori di recupero (9.2.7) ottenuti nelle diverse prove (9.2.8) per ottenere il recupero medio (Rm) e la deviazione standard del metodo.

Nota: Valori indicativi di recupero medio (%) per i livelli di fortificazione di 2 e 20 micron g/g sono rispettivamente di 91,9 +/- 6,2 e 96,3 +/- 3,8 con un valore medio di 94,3 +/- 5,3..

10. Sicurezza

L'acido domoico e' una neurotossina e deve essere maneggiata con cautela.

Acetonitrile e metanolo sono solventi tossici e volatili.

L'acido trifluoroacetico e' tossico, volatile e corrosivo e deve essere maneggiato sotto cappa.

Tutte queste sostanze sono nocive se ingerite, inalate o assorbite per via cutanea.

11. - Riferimenti

Quilliam, M. A., Xie, M., and Hardstoff, W. R. (1995) J. AOAC Int. 78, 543-554.